

# METHOD OF MULTIPLEX LIGASE CHAIN REACTION

**Publication number:** JP7505293 (T)

**Publication date:** 1995-06-15

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**






- international: **C07K14/47; C12M1/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; G01N33/558; C07K14/435; C12M1/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; G01N33/558; (IPC1-7): C12M1/00; C12N15/09**

- European: **C07K14/47A4; C12N15/10; C12Q1/68B; C12Q1/68D6; C12Q1/68M6; G01N33/558**

**Application number:** JP19930517672T 19930331

**Priority number(s):** WO1993US03034 19930331; US19920860702 19920331

## Also published as:

 WO9320227 (A1)  
 ES2153379 (T3)  
 EP0633944 (A1)  
 EP0633944 (A4)  
 EP0633944 (B1)

more >>

Abstract not available for JP 7505293 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9320227 (A1)**

The invention relates to multiplex ligase chain reaction (LCR). Two or more putative target sequences are selected. For each one, a set of four probes is used simultaneously to amplify the putative sequence if it is present in the sample. Preferably, all the amplicons are labeled with a common label/hapten and, for each different target, with a unique label/hapten. The invention also relates to an immunochromatographic strip device and method employing a diagonal array of capture spots.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-505293

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)6月15日

(51)Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 M 1/00

A 9050-4B

9281-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21)出願番号 特願平5-517672  
 (86)(22)出願日 平成5年(1993)3月31日  
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)9月30日  
 (86)国際出願番号 PCT/US93/03034  
 (87)国際公開番号 WO93/20227  
 (87)国際公開日 平成5年(1993)10月14日  
 (31)優先権主張番号 860,702  
 (32)優先日 1992年3月31日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, U S

(71)出願人 アボット・ラボラトリーズ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、  
 アボット・パーク、ワン・アボット・パーク・ロード、チャド・0377/エイ・ピー・6・デュー2  
 (72)発明者 ボウマ、スタンレイ・アール  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60030-3033、  
 グレイスレイク、ハンティントン・サークル・17271  
 (74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重リガーゼ連鎖反応方法

(57)【要約】

本発明は多重リガーゼ連鎖反応(LCR)に係わる。2つ以上の推定標的配列が選択される。各々に対して、推定配列が試料中に存在するならばそれを増幅するために4つで1組のプロープが同時に使用される。全ての増幅産物は共通ラベル/ハプテンで標識されており、各異なる標的ごとに固有ラベル/ハプテンで標識されているのが好ましい。本発明はイムノクロマトグラフィーストリップ装置及び斜線状に並ぶ捕獲スポットを使用する方法にも係わる。

## 請求の範囲

1. a. 複数の標的核酸配列のうちの1つ以上を有すると推定される試料の核酸を一本鎖核酸として含む反応溶液を与えるステップ；

b. 各指定標的配列に対して、前記反応溶液中に少なくとも4つの核酸プローブ（1プローブセット）を与えるステップであって、i）第1及び第2プローブは一次プローブであり、第3及び第4プローブは二次核酸プローブであり；ii）前記第1プローブは、標的核酸の第1鎖の第1セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iii）前記第2プローブは、標的核酸の前記第1鎖の第2セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iv）標的の前記第1鎖の第1セグメントの5'末端は、標的の前記第1鎖の第2セグメントの3'末端に対して、前記第1及び第2プローブが前記標的核酸の前記第1鎖にハイブリダイズしたときに第1プローブを第2プローブに結合し、第1部分及び第2部分を有する再構成一次分子を形成し得るよう配置され；v）前記第3プローブは前記再構成一次分子の第1部分にハイブリダイズし得；且つvi）前記第4プローブは前記再構成一次分子の第2部分にハイブリダイズし得、前

3. 前記ステップcのサイクルを20〜約60回繰り返す請求項1に記載の方法。

4. 各プローブセットの少なくとも1つのプローブが検出可能なラベルを有しており、前記検出可能なラベルの各々が相互に区別可能である請求項1に記載の方法。

5. 前記検出可能なラベルが、異なる特異的結合メンバーの特異性に基づいて区別可能であるハプテンを含む請求項4に記載の方法。

6. 前記プローブセットの各々を、一緒にハイブリダイズしたときに前記再構成分子が2つのラベルで標識され、そのうちの少なくとも一方は各プローブセットごとに異なる固有ラベルであるような2つの異なるラベルで標識する請求項1に記載の方法。

7. 他方のラベルが、各プローブセットに関し同一の共通ラベルである請求項6に記載の方法。

8. 前記共通ラベルを検出に使用し、放射線同位元素、蛍光団、化学発光団及びハプテンからなる群から選択する請求項7に記載の方法。

9. 前記固有ラベルが固有特異的結合メンバーからなり、各固有特異的結合メンバーが他の全ての特異的結合メンバ

記再構成一次分子の第1部分が該再構成一次分子の第2部分に対して、前記第3及び第4プローブが前記再構成一次分子にハイブリダイズしたときに第3プローブを第4プローブに結合し、再構成二次分子を形成し得るよう配置され、

各指定標的配列に対して、前記プローブセットを、他のプローブセットの各々の存在下に前記結合を可能にする濃度で与えるステップ；及び

c. i）前記プローブを前記試料中の核酸にハイブリダイズし；

ii）前記結合を実施して前記再構成分子を形成し；更に

iii）前記試料中の核酸を変性する

サイクルを繰り返すステップであって、

連続サイクルによって、反応溶液中に存在する各指定標的配列に対して、前記再構成一次及び二次分子の量を増加するステップ

を含む多重リガーゼ連鎖反応を実施する方法。

2. 前記結合をリガーゼ酵素またはリガーゼ酵素及びポリメラーゼ酵素によって行なう請求項1に記載の方法。

一からも区別可能である請求項6に記載の方法。

10. 前記固有ラベルが特異的ハプテンからなる請求項9に記載の方法。

11. 前記固有ラベルが特異的ハイブリダイゼーションプローブからなる請求項9に記載の方法。

12. 前記固有特異的結合メンバーを、1つのプローブセットの再構成分子を少なくとも1つの他のプローブセットの再構成分子から分離するために使用する請求項9に記載の方法。

13. 前記分離を、各特異的結合メンバーに対する特異的結合相手を固相上の異なる位置に固定することにより行なう請求項12に記載の方法。

14. 前記分離を、各特異的結合メンバーに対して特異的結合相手を固相上に固定することにより行い、前記固相が、相互の区別を可能にする特性を有することを特徴とする請求項12に記載の方法。

15. 複数の標的核酸配列の各々の存在、不在または量を、

a. 複数の標的核酸配列のうちの1つ以上を有すると推定される試料の核酸を一本鎖核酸として含む反応溶液を与えるステップ；

b. 各指定標的配列に対して、反応溶液中に少なくとも2つ、必要によっては4つの核酸プローブ（1プローブセット）を与えるステップであって、i）第1及び第2プローブは一次プローブであり、任意の第3及び第4プローブは二次核酸プローブであり；ii）前記第1プローブは、標的核酸の第1鎖の第1セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iii）前記第2プローブは、標的核酸の前記第1鎖の第2セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iv）標的の前記第1鎖の第1セグメントの5'末端は、標的の前記第1鎖の第2セグメントの3'末端に対して、前記第1及び第2プローブが前記標的核酸の前記第1鎖にハイブリダイズしたときに第1プローブを第2プローブに結合し、第1部分及び第2部分を有する再構成一次分子を形成し得るよう配置され；v）前記第3プローブは前記再構成一次分子の第1部分にハイブリダイズし得；且つvi）前記第4プローブは前記再構成一次分子の第2部分にハイブリダイズし得、前記再構成一次分子の第1部分が再構成一次分子の第2部分に対して、前記第3及び第4プローブが前記再構成一次分子にハイブリダイズしたときに第3プローブを第4プローブに結合し、再構成二次分子を形成し

定するステップ

からなる多重リガーゼ連鎖反応によって検出する方法。

16. 前記結合をリガーゼ酵素またはリガーゼ酵素及びポリメラーゼ酵素によって行なう請求項15に記載の方法。

17. 前記第3及び第4プローブを与え、前記ステップcのサイクルを10～約100回繰り返す請求項15に記載の方法。

18. 前記ステップcのサイクルを20～約80回繰り返す請求項15に記載の方法。

19. 前記プローブを、前記再構成分子が2つのラベルで標識され、そのうちの少なくとも一方は各プローブセットごとに異なる固有ラベルであるように2つのラベルで標識する請求項15に記載の方法。

20. 前記プローブを、前記再構成分子が2つのラベルで標識され、そのうちの少なくとも一方は各プローブセットごとに異なる固有ラベルであり、他方は共通ラベルであるように2つのラベルで標識する請求項17に記載の方法。

21. 前記共通ラベルを検出に使用し、放射性同位元素、蛍光団、化学蛍光団及びハプテンからなる群から選択する請求項20に記載の方法。

得るよう配置され、

各プローブセットの少なくとも1つのプローブが検出可能なラベルを含んでおり、各プローブセットに関連する前記検出可能なラベルは他のプローブセットに関連する検出可能なラベルから区別可能であり、従って各指定標的配列の存在、不在または量を判定し得、

各指定標的配列に対して、前記プローブセットを、他のプローブセットの各々の存在下に前記結合を可能にする濃度で与えるステップ；

c. i）前記プローブを前記試料中の核酸にハイブリダイズし；

ii）前記結合を実施して前記再構成分子を形成し；

更に

iii）前記試料中の核酸を変性する

サイクルを実施するステップであって、

各サイクルによって、反応溶液中に存在する各指定標的配列に対して、再構成一次分子及び必要によっては再構成二次分子の量を増加するステップ；及び

d. 反応溶液中の標的核酸の存在または量の指標として前記プローブセットの各々に関連する検出可能なラベルを測

22. 前記固有ラベルがハプテンからなり、各固有ハプテンが他の全ての固有ハプテンとも異なる請求項20に記載の方法。

23. 前記固有ラベルが特異的ハイブリダイゼーションプローブからなる請求項20に記載の方法。

24. 前記固有ハプテンを、異なる再構成分子を分離するために使用する請求項20に記載の方法。

25. 前記分離を、各固有ハプテンに対する特異的結合相手を固相上の異なる位置に固定することにより行なう請求項24に記載の方法。

26. 前記分離を、各固有ハプテンに対する特異的結合相手を固相上に固定することにより行い、前記固相が、相互の区別を可能にする特性を有することを特徴とする請求項24に記載の方法。

27. 複数の被分析物質を多重検出するためのイムノクロマトグラフィー装置であって、

毛管作用によって液体を輸送し得る多孔質材料ストリップであって、輸送液を接触するための端部から距離を置いて設けられた第1及び第2個別スポットにおいてストリップ上に固定された第1及び第2固有検出試薬を少なくとも

有しており、前記第1及び第2固有捕獲試薬が異なる第1及び第2被分析物質に対してそれぞれ特異的であるストリップを具備しており、

前記第2個別スポットが前記第1個別スポットから、縦方向を液体の流れる方向とすると、横方向及び横方向の両方で間隔を置いて配置されている装置。

28. 3つ以上の個別スポットが与えられており、前記スポットが、実質的に斜線状に並ぶスポットを形成するように、縦及び横の両方向で全てが相互に間隔を置いて配置されている請求項27に記載の装置。

29. 毛管作用によって液体を輸送し得る多孔質材料ストリップであって、輸送液を接触するための端部から距離を置いて設けられた第1及び第2個別スポットにおいてストリップ上に固定された第1及び第2固有捕獲試薬を少なくとも有しており、前記第1及び第2固有捕獲試薬が異なる第1及び第2被分析物質に対してそれぞれ特異的であり、前記第2個別スポットが前記第1個別スポットから、縦方向を液体の流れる方向とすると、横方向及び横方向の両方で間隔を置いて配置されているストリップを準備すると共に、被分析物質を含むと推定される試験溶液を準備し：

#### 明 細 書 多重リガーゼ連鎖反応方法

##### 背景：

本出願は、DNAの増幅、特にリガーゼ連鎖反応（以降“LCR”と記す）を使用する複数の標的配列の同時増幅に係わる。本発明は、本出願人名義の1992年3月31日出願の同時係属の米国特許出願第07/860,702号の一部係属出願であり、該特許は参照により本明細書の一部を構成するものとする。

本出願は、1987年12月11日出願の米国特許出願第181,936号（係属中）；前記出願の係属出願である1991年6月25日出願の米国特許出願第720,789号（係属中）；1990年1月26日出願の米国特許出願第470,674号（放棄）；及び前記出願の一部係属出願である1991年1月9日出願の米国特許出願第634,771号（係属中）を含む、LCRに係わる幾つかの他の特許に関連がある。欧州特許出願公開第320,308号は米国特許出願第181,936号に対応しており、欧州特許出願公開第439,182号は米国特許出願第634,771号に対応していることに留意されたい。同特

許出願は、前記試験溶液に、該溶液が毛管作用によって少なくとも最も速くにある捕獲スポットまで輸送される条件下に接触させ：

各捕獲スポットにおいて被分析物質が前記捕獲スポットに結合したかどうか判定する

ことからなるイムノクロマトグラフィーを実施する方法。

30. 前記被分析物質の少なくとも1つが標的ポリヌクレオチドである請求項29に記載の方法。

31. 前記標的ポリヌクレオチドを少なくとも1つのハプテンで標識し、前記ハプテン及び抗ハプテン抗体を前記捕獲スポットにおいて被分析物質を捕獲するために使用する請求項30に記載の方法。

許出願公開明細書はその全部が参照により本明細書の一部を構成するものとする。

LCRは、検出可能な標的分子の数を指数関数的に増幅する方法である。該方法は2対のプローブの使用を必要とする。第1の対または一次対は、標的配列の一方の側に近接位置でハイブリダイズし、鋳型依存的に連結し、再構成一次分子を形成する。第2の対は、再構成一次分子にハイブリダイズし得る。LCRは、Backmanらによって欧州特許出願公開第320,308号に最初に記載された。それ以後、これについて多くのことが記述されている。例えば、Wallace, 欧州特許出願公開第336,731号；Urgel, 国際出願WO89/09835号；Richards, 国際出願WO89/12696号；Segev, 国際出願WO90/01069号；及びBarany, Proc. Natl Acad Sci USA 88:189-193(1991)を参照されたい。“Gap(ギャップ)”LCRとして公知の変形LCRは欧州特許出願公開第439,182号及びSegevの国際出願WO90/01069号に記載されている。

プラント末端化された二本鎖(duplexes)を形成し得る2対のプローブを使用する代わりに、一方のプローブ対の

少なくとも1つのプローブが最初に“変性”末端を含んでいると、それによって得られた二本鎖は“非プラント”となり、及び／または2つのプローブ二本鎖のリガーゼ触媒融合に適した基質とならない。“変性末端”は、(1)通常のPCR条件下でリガーゼ触媒融合に必然的に関与する基(例えば5'リン酸または3'ヒドロキシル)上にブロック部分(または追加塩基残基)を有するか、または(2)1つのプローブの末端と次のプローブの末端との間に“ギャップ”を形成すべく塩基が欠落されているかのいずれかである。

“ギャップ”態様においては、変性末端は、1つ以上のプローブから短い塩基配列を除去し、それによって、2つのプローブが標的(または標的相補体もしくはこれから生成されるポリヌクレオチド)にハイブリダイズしたときに一方のプローブの5'末端と他方のプローブの3'末端との間に凹部またはギャップを残すことにより形成される。PCRによって標的を増幅するためには、プローブ間のギャップは充填される必要がある(即ち変性は“修正”されねばならない)。第1の態様においては、これは、ポリメラーゼまたは逆転写酵素と、過剰量の、ギャップに相対する標

オチド連結アッセイ(“OLA”)を提案しているが、“複数の非同位体レポーター基”の開発は未終了である。OLAは、相互に連結され、連結生成物が標的配列の存在の指標として検出される連続プローブを使用する。

上述の開示があるにも拘わらず、多重PCRは一般には使用可能ではない。当分野において、多重PCRの概念を実現する十分な指針は与えられていない。これは主に、PCRの条件をPCRに適用できないことが原因である。

#### 発明の要約

従って本発明者らは、7つほどの異なるプローブセットを用いる多重PCRの実現可能性を示した。1つの態様において本発明は、2つ以上の標的配列においてPCR増幅を同時に実施する方法を提供する。該方法は、

a. 複数の標的核酸配列のうちの1つ以上を有すると推定される試料の核酸を一本鎖核酸として含む反応溶液を与えるステップ；

b. 各推定標的配列に対して、反応溶液中に少なくとも4つの核酸プローブ(1プローブセット)を与えるステップであって、1)第1及び第2プローブは一次プローブであり、第3及び第4プローブは二次核酸プローブであり；

的鎖に相補的なデオキシヌクレオチド三リン酸とを使用し行ない得る。或いは、標的に相補的な第5プローブと、この第5プローブに相補的な第6プローブとを与えることによっても行ない得る。

PCR即ちポリメラーゼ連鎖反応はDNAを増幅する別の方法である。PCRは、二本鎖標的の相対する側にハイブリダイズする2つのプライマーを使用する。ポリメラーゼは、標的を鋳型として使用し、適当な相補ヌクレオチドを順次付加することによりプライマーの伸長を開始する。PCRは米国特許第4,883,195号及び第4,883,202号に記載されており、これらの特許明細書の全開示内容は参照により本明細書の一部を構成するものとする。

PCRは、複数の標的配列の存在を単一反応で判定するという多重方式で使用されている。欧州特許出願公開第364 255号は、複数の標的配列をPCRによって同時に増幅するための複数のプライマーセットの使用を記載している。Chamberlain ら、Nucl. Acids Res., 16: 1141-56 (1988)にも同様の記述がなされている。

更に、Nickerson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8923-8927(1990)は、複数の標的配列のためのオリゴヌクレ

ii) 第1プローブは、標的核酸の第1鎖の第1セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iii) 第2プローブは、標的核酸の前記第1鎖の第2セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iv) 標的の前記第1鎖の第1セグメントの5'末端は、標的の前記第1鎖の第2セグメントの3'末端に対して、第1及び第2プローブが前記標的核酸の前記第1鎖にハイブリダイズしたときに第1プローブを第2プローブに結合し、第1部分及び第2部分を有する再構成一次分子を形成し得るよう配置され；v) 第3プローブは再構成一次分子の第1部分にハイブリダイズし得；且つvi) 第4プローブは再構成一次分子の第2部分にハイブリダイズし得、再構成一次分子の第1部分が再構成一次分子の第2部分に対して、第3及び第4プローブが前記再構成一次分子にハイブリダイズしたときに第3プローブを第4プローブに結合し、再構成二次分子を形成し得るよう配置され、更に

各推定標的配列に対して、前記プローブセットを、他のプローブセットの各々の存在下に前記結合を可能にする濃度で与えるステップ；及び

c. 1) 前記プローブを前記試料中の核酸にハイブリダ

イズし；

ii) 前記結合を実施して前記再構成分子を形成し；

更に

iii) 前記試料中の核酸を変性する

サイクルを繰り返すステップであって、

連観サイクルによって、反応溶液中に存在する各推定標的配列に対して、再構成一次及び二次分子の量を増加するステップを含む。

通常のケースでは、結合はリガーゼ酵素またはリガーゼ酵素及びポリメラーゼ酵素によって行われる。一般に、ステップcのサイクルは10～100回、好ましくは20～約60回繰り返される。

通常、各プローブセットに関連する相互に区別し得る固有の検出可能ラベルによって増幅産物を検出する。ラベルは、ハプテンまたはポリヌクレオチドのごとき特異的結合メンバーを含むのが好ましい。ラベルは、検出または分離のいずれかまたは両方に使用し得る。好ましい構成においては、各プローブセットを、一緒にハイブリダイズしたときに再構成分子が、少なくとも一方は固有ラベルであり、

であり；iii) 第2プローブは、標的核酸の前記第1鎖の第2セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖であり；iv) 標的の前記第1鎖の第1セグメントの5'末端は、標的の前記第1鎖の第2セグメントの3'末端に対して、第1及び第2プローブが標的核酸の前記第1鎖にハイブリダイズしたときに第1プローブを第2プローブに結合し、第1部分及び第2部分を有する再構成一次分子を形成し得るよう配置され；v) 第3プローブは再構成一次分子の第1部分にハイブリダイズし得；且つvi) 第4プローブは再構成一次分子の第2部分にハイブリダイズし得、再構成一次分子の第1部分は再構成一次分子の第2部分に対して、第3及び第4プローブが再構成一次分子にハイブリダイズしたときに第3プローブを第4プローブに結合し、再構成二次分子を形成し得るよう配置され、

各プローブセットの少なくとも1つのプローブが検出可能なラベルを含んでおり、各プローブセットに関連する検出可能ラベルは他のプローブセットに関連する検出可能ラベルから区別可能であり、従って各推定標的配列の存在、不在または量を判定し得、

各推定標的配列に対して、前記プローブセットを、他の

他方は各プローブセットに同一の共通ラベルである2つのラベルで標識されるように、2つの異なるラベルで標識する。

好ましい方法においては、共通ラベルを検出に使用し、固有ラベルを、1つのプローブセットの再構成分子を少なくとも1つの他のプローブセットの再構成分子から分離するために使用する。分離は、単一固相上の異なる結合位置によって、または相互の区別を可能にする特性を有することと特徴とする固相を使用することにより行ない得る。

第2の態様において、本発明は、複数の標的核酸配列の各々の存在、不在または量を、

a. 複数の標的核酸配列のうちの1つ以上を有すると推定される試料の核酸を一本鎖核酸として含む反応溶液を与えるステップ；

b. 各推定標的配列に対して、反応溶液中に少なくとも2つ、必要によっては4つの核酸プローブ（1プローブセット）を与えるステップであって、1) 第1及び第2プローブは一次プローブであり、任意の第3及び第4プローブは二次核酸プローブであり；ii) 第1プローブは、標的核酸の第1鎖の第1セグメントにハイブリダイズし得る一本鎖

プローブセットの各々の存在下に前記結合を可能にする濃度で与えるステップ；

c. i) 前記プローブを前記試料中の核酸にハイブリダイズし；

ii) 前記結合を実施して前記再構成分子を形成し；更に

iii) 前記試料中の核酸を変性する

サイクルを繰り返すステップであって、

各サイクルによって、反応溶液中に存在する各推定標的配列に対して、再構成一次分子及び必要によっては再構成二次分子の量を増加するステップ；及び

d. 反応溶液中の標的核酸の存在または量の指標として前記プローブセットの各々に関連する検出可能ラベルを測定するステップ

からなる多重リガーゼ連鎖反応によって検出する方法を提供する。

前述したのと同じ標識、分離及び検出の実形が本発明のこの態様においても有効である。

最後に本発明は、複数の被分析物質を多重検出するためのイムノクロマトグラフィー装置及び方法に係わる。該装

置は、液体を毛管作用によって輸送し得る多孔質材料ストリップであって、輸送液の接触に使用される一端から距離を置いて設けられた第1及び第2個別スポットにおいてストリップ上に固定された第1及び第2固有捕獲試薬を少なくとも有しており、前記第1及び第2固有捕獲試薬が異なる第1及び第2被分析物質にそれぞれ特異的であり、前記第2個別スポットが前記第1個別スポットから、縦方向を液体が流れる方向とすると、縦方向及び横方向の両方で間隔を置いて配置されているストリップを含む。装置は、3つ以上の個別スポットを含み、それらのスポットは、実質的に斜線状に並んだスポットを形成するように、縦方向及び横方向の両方で全てが相互に間隔を置いて配置されるのが好ましい。

上記装置を使用する方法は、前記接触端部を、被分析物質を含むと推定される試験溶液と、前記溶液が毛管作用によって少なくとも最も遠くにある捕獲スポットまで輸送されるような条件下で接触させ、各捕獲スポットにおいて被分析物質が前記捕獲スポットに結合したかどうかを判定することを含む。

本発明の方法及び装置は、抗原と抗体のごとき常用の特

“標的配列”または“標的核酸配列”は核酸（DNAまたはRNA）のセグメントである。セグメントは約10または15〜数百ヌクレオチドの長さとし得る。LCRにおいては、標的配列は通常約30〜約60ヌクレオチドであり、その配列は既知である。標的は、その存在が期待もしくは予想されるか、またはそれもしくはその変形が期待もしくは予想されるならば“推定配列”である。例えば2つの相互に排他的な対立遺伝子のどちらが存在するか判定するためのホモ接合体の多重LCRにおいては、一方しか存在しないであろうことは判っているが、両対立遺伝子を含む配列が推定標的配列となる。各対立遺伝子に対して考え得る代替配列は全てが推定標的である。

上述の“結合”ステップは、2つのプローブを相互に結合する幾つかの公知の方法を包含する。好ましい方法は熱安定性リガーゼの使用によるものであるが、他のリガーゼ及び他の結合物質も例外ではない。リガーゼは、上述の通り本明細書の一部を構成する欧州特許出願公開第320308号及びやはり参照により本明細書の一部を構成するものとする欧州特許出願公開第373962号で論議されている。結合は、化学的手段または光結合（photoligat

ions）によっても可能である。結合は更に、上述の通り本明細書の一部を構成する欧州特許出願公開439182号に教示のごとく変性末端を“修正”する中間ステップを含んでもよい。修正は、伸長物質（例えばポリメラーゼ）を用いてギャップを充填すること、及び（例えばエンドヌクレアーゼIVを用いて）ブロッキング基を切断することを含む。

#### 図面の簡単な説明

図1は、多重LCR検出に使用されるイムノクロマトグラフィーストリップの概略図である。

図2a及び図2bは、実施例7において患者試料に実施した多重LCRのイムノクロマトグラフィーストリップの結果を示す写真である。

図3は、実施例10において患者試料に実施した多重LCRのイムノクロマトグラフィーストリップの結果を示す写真である。

#### 詳細説明

本明細書において使用される“多重”プロセスなる用語は、2つ以上、一般には3つ以上の異なる標的配列について、同じ反応容器内で同時に方法またはプロセスを実施することを指す。従って多重LCRは、各推定標的配列に対して少なくとも1組4つのプローブを使用し、複数の標的についてLCRを実施する。同様に、“N重”LCR（Nは整数）なる用語は、N個の標的配列のうちの1つ以上を増幅または検出すべく実施されるLCRを指す。

反応溶液は一般に、患者から試料を採取し、細胞を破壊してDNAまたはRNAを放出させることにより調製する。洗剤を使用してもよいが、他の公知の試料調製方法も含まれる。特定の緩衝組成物は文献及び実施例から入手可能である。DNA及びRNAは、通常は加熱によって緊縮条件を変化させることにより一本鎖にする。

多重LCRのプローブは、通常のLCRのプローブとはほぼ相違はない。しかしながら、検出を容易にするため、各プローブセットの少なくとも1つのプローブは検出可能ラベルを担うべきである。更に、各プローブセットの検出可能ラベルは全てが、シグナル区別または空間的区別によって相互に区別し得る必要がある。以下に詳述するように、シグナル区別は、実質的に同じ場所にある（即ち均一アッ

ion）によっても可能である。結合は更に、上述の通り本明細書の一部を構成する欧州特許出願公開439182号に教示のごとく変性末端を“修正”する中間ステップを含んでもよい。修正は、伸長物質（例えばポリメラーゼ）を用いてギャップを充填すること、及び（例えばエンドヌクレアーゼIVを用いて）ブロッキング基を切断することを含む。



セイ) 標的をシグナルの相違 (例えば蛍光放射波長の相違即ち色の相違) によって区別し得ることを指す。これに対して空間的区別とは、シグナルの位置または場所に基づいて標的を区別し得ることを指す。空間的区別は分類としても知られており、サイズ、分子量、荷電密度または磁気的もしくは特異的結合特性などによって行ない得る。勿論、同じ系内で両タイプの区別を使用することが可能であり、それが望ましい場合が多い。

結果を判断するために分類が好ましい場合、好ましい実施態様は、そのうちの少なくとも一方は固有即ち区別可能なラベルである2つのラベルを使用する。他方のラベルは各プローブセットに共通とし得るが、これもまた固有であってもよい。使用する特定の方法に従って (下記参照)、共通ラベルまたは固有ラベルのいずれかを検出に使用し、他方のラベルを分離に使用し得る。

“ラベル”なる用語は、検出し得る特性または特徴を有する分子または基 (moiety) を指す。ラベルは、放射性同位元素、蛍光団または化学発光団のごとく直接検出可能なものでもよいし、ハプテンまたはポリヌクレオチドチールのごとく間接的に検出可能なものでもよい。検出またはシ

グナル生成のために間接ラベルを使用する場合、それらはシグナル生成複合体として使用される。“シグナル生成体”は、検出可能な特性または特徴を与える分子または基である。シグナル生成体は、コロイド粒子 (例えばコロイド金またはセレン) のごとく直接的でもあり得るし、酵素 (例えばアルカリ性ホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ) のごとく間接的でもあり得る。間接的シグナル生成体は、当分野において良く知られているように追加成分、例えば基質を必要とし得る。“シグナル生成複合体”は、抗体またはポリヌクレオチドのごとく特異的結合相手に結合されたシグナル生成体を含む。このような結合体は任意の公知の結合方法に従って作製し得る。

特に共通ラベルとして有効なラベルには放射性同位元素が挙げられる。しかしながら、放射能を区別し得るならば放射性同位元素を固有ラベルとして使用することもできる。同様に、蛍光団及び化学発光団は共通ラベルとして使用するのが最良である。(例えば波長に基づいて) シグナルを区別し得るならば、これらを固有ラベルとして使用することもできる。ハプテン、ポリヌクレオチドまたは他の特異

的結合メンバーは共通ラベルとして作用し得るが、特異的結合メンバーを相互に容易に区別し得れば、それは申し分なく固有ラベルに過ぎたものとなる。異なる特異的結合メンバーを使用する場合、換述する方法の1つに従えば、異なる特異的結合相手を阻む結合体を使用される。

多量のハプテンが公知であるが、ほぼ全てのハプテンが本発明に使用し得る。本発明では、特異的結合相手が既知であるかまたは作製し得ること (“ハプテン”の明確な特性)、及びハプテンがプローブに、そのハイブリダイゼーションを妨害しないように結合し得ることしか要求されない。ハプテンをプローブに付加する多数の方法が文献において公知である。Enzo Biochemical (ニューヨーク) 及び Clontech (Palo Alto) はいずれもプローブ標識法を記載及び市販している。例えば、3'-アミン-ON CPG<sup>®</sup> (Clontech, Palo Alto, CA) を使用して第一級アミンを3'オリゴ末端に付加し得る。同様に、Aminomodifier II (登録商標) (Clontech) を使用して第一級アミンを5'オリゴ末端に付加し得る。アミンは、慣用の化学的活性化及び結合方法を使用して種々のハプテンに反応し得る。

更に、同時係属出願である1990年12月11日出願

の米国特許出願第625,566号及び1990年12月20日出願の同第630,908号は、プローブを5'末端及び3'末端でそれぞれ標識する方法を教示している。前述の同時係属出願はいずれも参照により本発明の一部を構成するものとする。ハプテンの幾つかの例としては、多数の薬剤 (例えばジゴキシン、テオフィリン、フェンサイクリジン (PCP)、サリシレートなど)、T3、ピオチン、フルオレセイン (FITC)、ダンシル、2,4-ジニトロフェノール (DNA); 並びに、プロモウラシルのごとき変性ヌクレオチド及びN-アセチル-7-ヨウド-2-フルオレニルアミノ (AIF) 基の組込みにより変性された塩基; その他多数が挙げられる。本明細書に記載の幾つかのハプテンは同時係属中の本出願人名義の特許明細書、1991年12月17日出願の米国特許出願第07/808,508号 (アダマンタン酢酸) 及び米国特許出願第07/808,839号 (カルバゾール及びシベンソフラン)、1992年3月27日出願の米国特許出願第07/858,929号 (アクリリン) 及び米国特許出願第07/858,820号 (キノリン) に開示されている (これらを本明細書ではまとめて“ハプテン特許出願”と称する)。これらのハ

ブテン特許出願明細書の開示内容は参照により本明細書の一部を構成するものとする。

多重増幅または検出に必要なプローブの数は一般には推定配列数の4倍であると理解されたい。“N”個の異なる細菌微生物のアッセイの場合、必要とされるプローブの数は $4 \times N$ である。突然変異の遺伝子試験の場合には、Tを推定標的の数とすると $4 \times T$ プローブの法則が尚一般的、即ち通常のケースで成立つ。しかしながら、ある種の例外を以下に記載する。突然変異の型及び複雑性に従って各突然変異に対して幾つかの推定標的があり得ることに留意されたい。単純な単一塩基置換を例にとる。置換が常に1つの塩基型であることが既知であるならば、考え得る推定標的配列は野生型と突然変異置換との2つである。しかしながら、4つの塩基のいずれも遺伝子座において置換され得ることが既知であるならば、そのときは推定標的配列は4つとなる。一般に、第1のケースには $8(4 \times T, T=2)$ 個のプローブ、第2のケースには $16(4 \times T, T=4)$ 個のプローブが必要である。

各推定標的に対して4つのプローブという一般法則は、突然変異の型及び複雑性に拘わらず維持される。しかしな

L C Rの結果の判定は、相互に区別し得る標的及びバックグラウンドのグラフを生成するのに必要なサイクル数を考慮することを含み得る。所与のプローブ濃度に対して、バックグラウンドシグナルはnサイクル後に発せられる一方で、標的シグナルはたったtサイクル後には発せられる。L C Rが診断ツールとして有効であるためには、nはtよりずっと大きいこと、即ち標的とバックグラウンドの間に出来る限り大きな“サイクルウィンドウ”が存在することが望まれる（欧州特許出願公開第3 20 3 0 8号参照）。シグナルが“出現する”サイクル数はプローブ濃度と共に変化することも示されている。つまりプローブ濃度が高いほどシグナルの出現は早く、またこの逆も成立する。従って、多重L C Rにおいてはプローブ濃度を入念に調整することが好ましいことが見い出された。全ての反応は同数のサイクルで行われるので、全ての標的シグナルはおおよそ同時に“出現”するはずである。これは、各反応がおおよそ同じサイクル数でピークまたは少なくとも検出可能なシグナルレベルに達するよう、各プローブ濃度を入念に調整することにより保証され得る。所与のプローブセットに対してプローブ濃度をどのように調整すればよいか正確に予

がら、ある種の単純な突然変異においては、1つのセットの2つのプローブ（例えば、任意に、正しい2つ）が他のセットの2つの（正しい）プローブとしても作用し得、 $4 \times T$ より少ない数のプローブしか必要でなくなる。かかる単純突然変異としては、その末端が正確に既知である機かな欠失、挿入または置換が挙げられる。末端が既知である限りは、欠失、挿入または置換の大きさはその“単純”たる特性に影響しない。かかる“単純”突然変異に必要とされるプローブの数は $(2T+2)$ である。 $+2$ は突然変異の片側の共通プローブセットであり、 $2T$ は、突然変異の考え得る全ての順列、即ち考え得る全ての推定標的配列を表わす。勿論、考え得る順列の数は突然変異の特性に依存する。

$4T$ 末端のプローブしか必要でない別の“特殊ケース”としては、2つの突然変異が、それらの間に共通プローブを使用し得るのに十分に相互に接近しており、外側端部に特別プローブを有するという遺伝子の突然変異構成の場合が考えられる。この場合の“十分に接近して”とは、L C Rプローブが及び得る距離を意味しており、一般にこの距離は約20～40塩基である。

測することは不可能であるが、これは単純な実験を通して経験的に容易に決定し得る。

L C Rにおけるプローブセットの融点はおおよそ同じであるべきことは一般に知られている。しかしながら、多重L C Rにおいては融点が8～10℃の幅で変化し得ることが見い出された。

多重L C Rの他の反応条件はより基本的なL C Rに使用されるものと同様である。同じ緩衝液、pH及び塩条件が一般に容認可能である。しかしながら、実施例に示すように幾分高めの濃度のリガーゼを添加することが望ましい。更に、ギャップ充填L C Rを使用するのであれば、ポリメラーゼを追加することも所望され得る。

上述したように、最も好ましい方法は共通ラベル及び固有ラベルという2つのラベルを含む。いずれかが検出ラベルとして作用し得る。簡単のため、実施態様は共通及び固有ラベルの両方にハプテンを使用して記載する。勿論、少なくとも一方のハプテン、特に共通ハプテンを別のラベルで容易に置き換えられることが理解される。

好ましい標準的なL C R方法によれば、第1ハプテンは再構成分子を捕獲及び分離するために使用される。第2ハ

ブテンは再構成複合体をシグナル生成体に結合するために使用される。この過程は欧州特許出願公開第439 182号により完全に記載されている。例えばフルオレセイン部分を第1組の第1ブロープの5'末端と第1組の第2ブロープの3'末端とに付加する。更に、異なるハプテン例えばビオチンを第2組の第1ブロープの3'末端と第2組の第2ブロープの5'末端とに付加する。再構成分子が複製されると、2つのビオチンが複製体の一端に認められ、2つのフルオレセインが他端に認められる。抗フルオレセインの被膜を有する固相を使用し、結合しなかったビオチンを有するブロープから再構成分子を分離する（結合しなかったフルオレセインを有するブロープも捕獲される）。分離された複合体は、酵素のごとき検出可能なシグナル生成体で標識されたアビジンまたは抗ビオチンを使用することにより検出される。

多重LCRにおいては、上記分離及び検出系はわずかに変更されるだけでよい。再構成分子の一端（検出または捕獲）に全てのブロープセットに共通の1つのハプテンを使用することは尚可能である。分子の他端を例えば固有ハプテンによって区別可能にしさえすればよい。2つの異なる

ので、第2のより好ましい方法は、共通ハプテン／ラベルを検出機能として使用し、1つ以上の固相上で標的を相互に分離するために固有ハプテンを使用することを含む。例えば、（例えば操作、濾過、クロマトグラフィー、沈降、遠心、地場などによって）物理的に分離し得るビーズまたは微粒子を固相として使用し得る。このような分離可能な固相群の各々を、固有ハプテンの1つに対する抗体でそれぞれ被覆する。多重LCRを実施し、かかる固相を用いてインキュベートした後、固相群を分離し、共通シグナル生成複合体を共通ハプテンと反応させる。種々の固相群の1つ以上にシグナルが出現することにより、種々の配列が判定される。

再構成分子を分離するのにドットブロットも有効である。シート様固相上の個別位置に、幾つかの固有ハプテンに対する抗体を固定する。このシートを反応溶液と共にインキュベートすると、固有ハプテンに対する抗体の特異性に基づいて再構成分子が分離される。ここでも、共通ハプテンをシグナル生成複合体と共に使用し、再構成分子を含む位置にシグナルを生成する。固相は、シグナルの位置（及び必要によっては強度）に基づいて判断される。

方法が考え得る。

第1に、共通ハプテン（例えばビオチン）を使用して全ての再構成分子を捕獲し得る。次いで、特異的ハプテン、及び区別可能なシグナル生成体を含む抗ハプテン複合体を使用することにより、異なる複合体を区別し得る。例えば（上述のごとく向き及び適正なブロープ末端を考慮することに留意し）、標的A用のブロープをビオチン及びフルオレセインで標識し、標的B用のブロープをビオチン及びタンシールで標識し、標的Cのブロープをビオチン及びジゴキシンで標識する。全ての再構成分子（及びビオチニル化ブロープ）が固相上に捕獲される。標的Aが存在する場合にはコロイド金に結合した抗フルオレセインが赤褐色を呈し、標的Bが存在する場合にはコロイドセレンに結合した抗タンシールがピンク系色を呈し、標的Cが存在する場合にはポリビニルラテックスに結合した抗ジゴキシンが黒色を呈する。或いは、抗体を、その基質または産物が異なる色を呈する種々の酵素（例えばアルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ）に結合してもよい。

単一固相上で種々の色を見分けることは困難であり得る

上記方法の変形は、固有ハプテンをもとに再構成分子を分離するためにイムノクロマトグラフィーを使用する。固相を反応溶液と共にインキュベートするのではなく、固相は多孔質クロマトグラフィー材料であり、反応溶液はそれを通して吸い上げられ、毛管作用によって移動する。好ましい多孔質材料はニトロセルロースである。ドットブロット方法と同様に、各固有ハプテンに対する抗体がストリップ上の種々の位置、好ましくは斜線に沿って固定される。全ての再構成分子を担う反応溶液が固定抗体スポットに出会うと、相補ハプテンを担う再構成分子はその位置に“捕獲”及び固定される。この方法は欧州特許出願公開第357 011号に記載の方法の変形であり、該特許の開示内容（特に標的核酸のイムノクロマトグラフィー検出に係わる部分）は参照により本明細書の一部を構成するものとする。以下の実施例はこの方法を説明するものである。

種々のポリヌクレオチド標的（場合によっては定例被分析物質）の捕獲スポットが図1に示すように斜線状に並ぶ場合、イムノクロマトグラフィー法は最も効果を発揮することが見出された。幾つかの理由により捕獲スポットを両方向で空間的に分離することが望ましい。第1に、縦方

向の分離は、シグナルを降り合うスポットからより良く区別するのに有効である。しかしながら、スポットがこの方向にしか離されていないと、ラベルが最初の陽性捕獲スポットに累積しがちとなる。このスポットから下流のスポットは“陰に隠され”、通常は容易にはシグナルを発しない。従って、スポットを横方向でも分離するのが好ましい。横方向でのみ間隔が置かれたスポットは、ストリップを読取るのに必要な分解能を得るためにより幅の広いストリップを必要とする。

上述の方法の別の変形においては、再構成分子を、ハプテンの代わりに配列特異的プローブハイブリダイゼーションによって分離及び／または検出し得る。この変形は、分離可能な固相群、シート様固相及びクロマトグラフィー媒体を用いて行ない得る。唯一の相違は、固有ハプテン特異的抗体を固相上に固定する代わりに、ハイブリダイゼーションプローブを固定し、そのプローブが、第1組の第1または第1組の第2プローブ（即ち先の変形における固有ハプテンを担う同じプローブ）中に認められる配列に特異的であることである。クロマトグラフィー媒体特異的ハイブリダイゼーション方法は欧州特許出願公開第387 896

V) 6、8、11、16、18、31及び33型は全て存在が知られている。汎用即ちコンセンサスプローブ及びプライマーは、型に係わらず全てのH P Vを増幅する。しかしながら、16、18及び恐らくは33型のみが、癌発生に関連することから臨床上重要である。従って、多重L C Rアッセイによって各変異株の型特異的増幅を同時に行い得る。このことで、単純な汎用増幅または1つの型の単純な型特異的増幅からは入手し得ない更なる臨床情報が与えられる。この方法は、少なくとも2つの公知の型を有するH i V、少なくとも15の血清型(serovars)を有するCh lamydia trachomatisに有効である。

単一の微生物のみが問題である場合に多重L C Rを実施することも有効となり得る。例えば、複数の標的配列を、確認または特異性向上のために取り上げ得る。例えば、M O M P遺伝子及びクリプチック(cryptic)プラスミド由来の配列をC. trachomatis DNAを検出するために選択し得る。或いは、 $\beta$ -グロビン配列を増幅するプローブと所望の標的を増幅するプローブとを含むことにより、内部制御を行ない得る。

多重L C Rの別の用途はアイデンティティ試験にある。

号に更に記載されており、該特許の開示内容（特に被分析物質のイムノクロマトグラフィー検出に係わる部分）は参照により本明細書の一部を構成するものとする。

本発明の多重L C R法は、使用する標的のタイプに従って多数の用途を有する。まず、遺伝子スクリーニングまたは試験に有効である。特定の遺伝子疾患または特性は、ゲノム内の1つまたは有限数の位置にある遺伝コード中の突然変異または変化によって現れる。ある種の疾患または症状（例えば鎌状赤血球貧血、フェニルケトン尿症、テイ-サックス病、中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損症、囊胞性線維症）はDNA中の単一塩基の点変異によって現れる。他のもの（例えば囊胞性線維症、ジューシェン型筋ジストロフィー症(DMD)）は、1つまたは比較的少数のエキソン位置における短い変更または欠失によって現れる。多重L C Rを行ない得ることで、欠失/変化が特定の疾患の原因となることが既知である各エキソンにおいて、1個体のDNAを同時に分析し得る。

多重L C Rの他の用途は、一般に感染性微生物即ちウイルスの多様な変異株から生じる所定の細菌またはウイルス性疾患の診断にある。例えば、ヒト乳頭腫ウイルス(H P

一般集団中で高度にばらつきのある恐らく10以上の配列を選択し得る。かかる配列の各々の存在または不在を判定することにより、個体を、各特定のエキソン配列の存在または不在の固有パターンを用いて“分類”し得る。2進数形式で個体“A”は“0111001001”と同定され、個体“B”は“0000111011”と同定される。ここで“0”は特定のエキソン配列が不在であることを示し、“1”は特定のエキソン配列が存在することを示す。

その他の用途は当業者には容易に明らかであろう。

#### 実施例

説明を目的としており従って本発明を制限することのない以下の実施例を参照し、本発明はより完全に理解されるであろう。実施例を通して略号は下記の意味を有する。

- ・ B S A はウシ血清アルブミンを指す。
- ・ E P P S は緩衝液N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(3-プロパンスルホン酸)を指す。
- ・ N A D は、所定の生物学的反応のエネルギー源であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを指す。
- ・ P C R はポリメラーゼ連鎖反応を指す。
- ・ T R I S はtris-(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝

液を指す。

・ TTP は、ポリメラーゼの基質の 1 つであるチミジン三リン酸を指す。

・ Abbott TestPack Plus™ は、クロマトグラフィーまたは吸上げ式のイムノアッセイを示すのに使用される Abbott Laboratories の商標である。このアッセイ形式は、欧州特許出願公開第 4 2 1 2 9 4 号及び欧州特許出願公開第 3 6 7 0 1 1 号並びに他の文献に更に詳細に記載されている。

実施例 1 : オリゴ合成及びハブテン付加

パート A - 配列及び合成

下記のオリゴヌクレオチド (表 1 参照) を、モデル 3 8 0 A DNA シンセサイザー (Applied Biosystems, Foster City CA) において β-シアノエチルホスホリアミダイトを使用し既製方法に従って製造した。表中、x は 3'-アミノ-ONCPG™ (Clontech, Palo Alto, CA) から誘導される第一級アミンであり、y は Amino modifier II (登録商標) (Clontech) から誘導される第一級アミンであり、p は Phosphate-ON (登録商標) (Clontech) から誘導されるホスフェートであり、A、C、G 及び T は通常の意味を有する。ブ

表 1

配列 ID No.	配 列	長さ (bp)	DMD エキソン No.
1. 2. 3. 4.	YCACTGCGGGT TTTGCAAGC AATAA PATTTCTTCTG AAAAGCCGCA GT-イソペンチル pGTAAAGTAGTA CCTTGACAA GGTx YAGGCTTGCTC AGGCTACAC TTACA		4
5. 6. 7. 8.	CAGTTTCTG CTCACCAAGT GAGCA pGCTCACTTGT TGAGGCAAAA CTT-グンデル pGAAGCCATCG AGGAAGTGA AAX YATTTCACCTT CCTGGATGG TTCAA		8
9. 10. 11. 12.	YTAGATGCTTC TCAATGTCCA ATAGA pCTATGGGACA TTGAGAGGA TGT-キノリン pGCCCCCAAT CGGACATTC CATx YTAGGAAATGT TCGCATTTGG GGGCA		12
13. 14. 15. 16.	YACAGGCTGTC ACCAGCATC AGCCA pGGCTGAGTGG TGGTACACG CTA-キノリン pCACTAACACA GACAGCTGA ATGx YCCATTACAGT TGTCTGTCTT AGTGA	74' 66'	17
17. 18. 19. 20.	YCGTGATAAGC TGACAGAGTG AAACA pGTTTCACTCT GTACAGTTAT CAGG-イソペンチル pGTAAAGGCTT GAAAGGCCAA GTAGx YCTACTTGGCC TTTCAGCTT TACCA	69' 68'	19
21. 22. 23. 24.	YTTTACCTGTC AGCGGATTTG ACAGA pCTGTCAAAATC GCTTGCAGGT AAAX pCTGTTGAGAA ATGGCGGCTT TTEx YGAAGACGCGG CCAATTTCGA ACAGA		44
25. 26. 27. 28.	YTTGAATGCAA CTGGGGAAGA AATAA PATTTCTTCTG GAGTTGCAAT CA-グンデル pCAGCAATGCT CAAAACAGA TGAGx YGCATCTGTTT TTGAGGATTG CTGAA	66' 67'	45

ローブは左から右に 5' から 3' の向きで書かれている。融点は、プローブ対に対して第 1 及び第 2 ハイブリダイズ、並びに第 3 及び第 4 ハイブリダイズの順で与える。

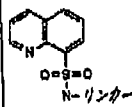
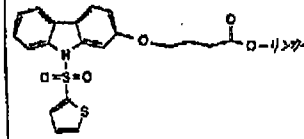
29. 30. 31. 32.	YAGAGCCTTGA AGAGCAGTTA AATCA pGATTTAACTG CTCTTCAAGG TCT-イソペンチル pCTGCTGCTGT GGTATCTTC TATx YATAGGAGAT AACACAGCA GCAGA		48
33. 34. 35. 36.	YCAAGTTATAA AATCAGAGAG GGTGA pCACCCTCTGT GATTTTATAA CTTx pGGTGGGTGAC CTGAGGATA TGAGx YTTGATATCTT CAAGGTACCC CACCA	65' 70'	51
37. 38. 39. 40.	YATAGTCTGTC AGGCTGACG TGGTA pCCAGCTTCAC CTGCCCCAC AG-ブリン pGAAGTTGCTG GTAGGCCCTT GAGx YCCAGGCGCTT CACCACCAAC TTCA-		ヒト β グロビン 遺伝子

オリゴ 1 ~ 4 は、Koenig H, Monaco AP 及び Kunkel, LM によって The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. Cell 53, 219-228 (1988) に記載されている採番方法 (numbering scheme) によると、ジュシェン筋ジストロフィー症 (DMD) 遺伝子のエキソン 4 の一部に特異的である。同じ採番方法によると、オリゴ 5 ~ 8 はジュシェン筋ジストロフィー症遺伝子のエキソン 8 の一部に特異的であり、オリゴ 9 ~ 12 は DMD 遺伝子のエキソン 12 の一部に特異的であり、オリゴ 13 ~ 16 は DMD 遺伝子のエキソン 17 の一部に特異的

であり、オリゴ17～20はDMD遺伝子のエキソン19の一部に特異的であり、オリゴ21～24はDMD遺伝子のエキソン44の一部に特異的であり、オリゴ25～28はDMD遺伝子のエキソン45の一部に特異的であり、オリゴ29～32はDMD遺伝子のエキソン48の一部に特異的であり、オリゴ33～36はDMD遺伝子のエキソン51の一部に特異的である。オリゴ37～40はヒトβ-グロビン遺伝子の一部に特異的であり、対照として使用した。

#### パートB-ハプテン付加

表1に示したように幾つかのオリゴヌクレオチドの3'末端にハプテンを結合した。ハプテン結合は標準β-シアノエチルホスホルアミダイト化学処理に従ったが、これは前述のハプテン関連の特許出願明細書に記載されている。同様の方法は、米国特許出願公開NTIS ORDER No. PAT-APPL-7-246, 688 (Cohen et al., 1989) において蛍光ラベル結合体についても記載されている。使用したハプテンの構造を下記の表2に示す。

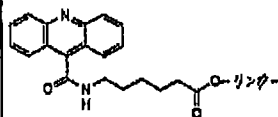
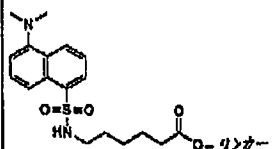
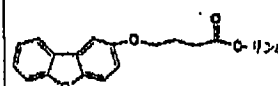
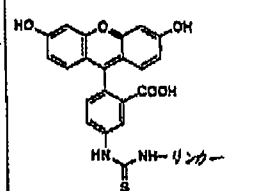
キノリン	
キオフェンカルボジール	

全てのオリゴヌクレオチドを逆相HPLCによって精製し、欠陥配列及びハプテン付加オリゴの場合にはハプテン未付加種を除去した。

#### 実施例2：ピオチニル化

実施例1のオリゴ3、4、7、8、11、12、15、16、19、20、23、24、27、28、31、32、35、36、39及び40のアミノ化末端を、実質的にUrdonら, Nucl. Acids Res., 16(11): 4937-4956(1988)の方法に従ってピオチンで標識した。簡単に述べると、最高で1mgのオリゴを100μlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝

表2

ハプテン	構造
アクリジン	
クインソル	
ジベンゾフラン	
フルオレセイン	

液, pH 7.5中に溶解し、100μlのジメチルホルムアミド(DMF)中の2mgのピオチン-(アミノカプロイル)2-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いて室温で16時間処理した。

最高で1mgのオリゴを100μlの0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液, pH 9.0中に溶解し、2mgのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を用いて室温で15時間処理することにより合成し、オリゴ22(3'末端)と83(5'末端)をフルオレセインに結合した。或いは、オリゴ33にハプテン付加するのではなく、オリゴ34の8'アミノ化末端をFITCと反応させてもよい。

全てのピオチン及びフルオレセイン標識オリゴヌクレオチドをSephadex (登録商標) G-25 (Pharmacia, Piscataway NJ) によるカラムクロマトグラフィー、分離用ゲル電気泳動及びエタノール沈殿によって精製した。

品質管理のため、LCR実施後の再構成分子の保水性をIMx (登録商標) 装置 (Abbott Labs) において、欧州特許出願公開第439 182号に教示のごとき一般的なピオチン/フルオレセイン二ハプテン付加複合体を使用してモニターした。このため、オリゴ1、9、13、17、

21、25及び29は5'第一級アミンを付けて合成した。オリゴの一部は前述のごとくフルオレセインと反応させ、1 M x 分析に必要なビオチン/フルオレセイン複合体を与えた。しかしながら、多重LCRに使用する場合は、ハプテン未付加のアミノ化オリゴを使用した。

#### 実施例3：LCR反応条件

実質的に欧州特許公開第439 182号に記載の“ギャップ充填”改良LCRにおいて、実施例2の標識オリゴを種々の組合せで使用した。通常、0.5 mlポリプロピレン試験管内で下記の試薬を混合した。

試薬	終濃度
水	(終容積45 µlを与える量)
反応緩衝液	15mM EPPS pH7.8 20mM KCl 30mM MgCl <sub>2</sub>
オリゴヌクレオチド	表3参照
NAD	0.1mM
TTP	1 µM
試料	250ng DNA
鉱油	2滴/試験管

#### 実施例4：抗体及び固相

ウサギにおいてハプテンとウシ血清アルブミン(BSA)またはkeyhole limpetヘモシアニン(KLH)との複合体から調製した免疫原に対する抗血清を生成した。かかる血清の調製及び詳細は前述のハプテン関連特許出願明細書に記載されているが、抗体を産生する任意の公知の方法が十分となり得る。かかる血清はプロテインA Sepharose(登録商標)(Pharmacia)を通すことにより精製した。

ゲンシルに対する抗血清は、University of Pennsylvania (Fan, S-T.及びKarusa, F. Molecular Immunology 21:1 023-1029(1984))から得たマウスモノクローナルであった。

かかる抗血清を0.1 M TRIS pH7.8, 0.9% NaCl, 0.1% BSA、1%スクロース及び微量のフェノールレッドで希釈した。希釈した抗血清の一部(0.2 µl)を寸法約4×50 mmのニトロセルロース(Schleicher and Schuell AE 98.6 µm)のストリップ上に規則的なパターン(図1参照)でスポットした。抗血清の濃度は表4に示す通りであった。

混合物を100℃で3分間加熱し、冷却し、下記の試薬を5 µlの量で添加し、最終反応容積50 µlとした。

試薬	終濃度
Thermus thermophilus 由来のDNAリガーゼ	3400 U/50 µl
Thermus由来のDNA ポリメラーゼ(MBR Inc., Milwaukee WI)	1.2 U/50 µl

上記混合物に37サイクルのプログラムされた温度変化を実施した。1サイクルは85℃で30秒間、45℃で20秒間からなった。熱サイクルはTempCycler™ (Coy Laboratory Products, Ann Arbor MI)において実施した。

表3

検出エキソン	使用オリゴ	濃度 (反応試験管(50 µl)当たりの各オリゴの分子数)
エキソン4	1~4	$1.5 \times 10^{12}$
エキソン8	5~8	$7.7 \times 10^{11}$
エキソン12	9~12	$3.8 \times 10^{11}$
エキソン17	13~16	$7.7 \times 10^{11}$
エキソン18	17~20	$7.7 \times 10^{11}$
エキソン44	21~24	$3.8 \times 10^{11}$
エキソン45	25~28	$3.8 \times 10^{11}$
エキソン48	29~32	$3.1 \times 10^{11}$
エキソン51	33~36	$3.8 \times 10^{11}$
β-グロビン	37~40	$7.7 \times 10^{11}$

表4

抗血清	濃度(mg/ml)
アクリジン	2.55
ゲンシル	0.5
ジベンゾフラン	3.4
フルオレセイン	0.5
キノリン	0.75
チオフェンカルバゾール	0.25

#### 実施例5：ラベル結合

Yost, D.A.ら(米国特許第4,954,452号(1990))の方法に従ってコロイドセレンを調製した。コロイドを水で希釈し、545nmにおいて光学濃度1.6を得た。この懸濁液1 mlに1 mg/mlの抗ビオチン(Abbott Laboratories) 1 µlと100 mg/mlのBSA 60 µlとを添加した。この混合物を渦攪拌ミキサー(vortex mixer)において1分間混合した。

#### 実施例6：多重イムノクロマトグラフィー

実施例3のLCR反応混合物を、実質的に欧州特許公開第857 011号の方法に従い、Abbott TestPack Plus™イムノクロマトグラフィーによって分析した。簡単に述べると、実施例5のコロイド懸濁液(1.5 µl)を緩衝液(14 µl; 0.1 M TRIS pH7.8, 0.9% N

aCl、3%アルカリ処理カゼイン)で希釈し、LCR反応産物(1μl)と混合した。実施例4のニトロセルロースストリップを懸濁液に適用した。5分後、クロマトグラフィー過程は終了し、ニトロセルロースストリップを反応/コロイド懸濁液から取り出し、乾燥させた。抗体添加部位に着色スポットが存在すれば、それは特異的LCR産物が存在することを示している。

#### 実施例7: DMD患者試料の分析

デュシェン筋ジストロフィー症の患者から得たヒトDNA試料のエキソン4、12、17、19、44、45、48及び51の存在を、オリゴ1~4及び9~36を使用して分析した。ヒトDNAの存在を検出するための対照処理としてオリゴ37~40を反応ミックスに含めた。各試料の分析は2つのパートで実施した。一方の反応試験管中には(エキソン17、19、45、48及び51;並びにヒトβ-グロビンを増幅するための)オリゴ13~28及び33~40を含む実施例3に記載の混合物を入れ、他方の試験管中には(エキソン4、12及び44;並びにヒトβ-グロビンを増幅するための)オリゴ1~4、9~12、29~32及び37~40を含むLCR反応ミックスを入

れた。分析は、試料DNAに実施例3に説くLCRを実施し、次いで得られたミックスを実施例6に従ってイムノクロマトグラフィーすることにより実施した。

図2に、イムノクロマトグラフィー後のニトロセルロースストリップの写真を示す。図2aの写真は7つのニトロセルロースストリップを示している。これらは、(下から上のスポットにおいて)ヒトβ-グロビン並びにDMDエキソン17、45、48、51及び19に特異的な増幅産物の存在を示している。試料はそれぞれ(左から右に)サケ精子DNA、5人のデュシェン筋ジストロフィー症患者(患者番号を写真中に示す)のDNA及び正常ヒトDNAを250ngを含んでいた。同様に、図2bの写真は5つのニトロセルロースストリップを示している。これらは、(下から上のスポットにおいて)ヒトβ-グロビン並びにDMDエキソン12、4及び44に特異的な増幅産物の存在を示している。試料はそれぞれ(左から右に)サケ精子DNA、3人のデュシェン筋ジストロフィー症患者(患者番号は写真中に示さず(左から右に)患者5294、4036及び638である)のDNA及び正常ヒトDNAを250ngを含んでいた。

各患者に欠失しているエキソンはPCRから既知である(表5参照)。

表 5

患者番号	欠失エキソン(PCRによる) 他の全ては増幅される
4722	17, 19, 45, 48及び51 (44は試験せず)
5284	4, 12, 17及び19
5303	45
5396	51
638	4, 12, 17, 19, 44及び46
4036	12及び44 (17, 19, 45, 48及び51は試験せず)

#### 実施例8: 遺伝性筋萎縮症のオリゴ合成

モデル380A DNAシンセサイザー(Applied Biosystems, Foster City CA)においてβ-シアノエチルホルムアミダイトを使用し、既製方法に従って下記のオリゴヌクレオチド(表6参照)を合成した。表中、pはPhosphate-ON(登録商標)(Clontech)から誘導されるホスフェートであり、ビオチンはBiotin-ON(登録商標)(Clontech)を使用して導入され、A、C、G及びTは通常の意味を有する。プローブは左から右に5'から3'の向きで書かれている。表中のハプテン付加は実施例1に記載のごとく実

施した。

表 6

配列 ID No.	配 列	CF 検査結果
41. 42. 43. 44.	Dnasyl-UTGGAATCAG ACIGAGTGG GA pCTCCACTCA GTGAGATCC AC pTCAACGAGCA AGAATTTCCT T-ビオチン biotin-AAAGAAATTC TTGTCGTTG A	G551D
45. 46. 47. 48.	biotin-ATTCATAC TTTCGACAG TG pCACTGTTCGA AGGTATTGA AT-ビオチン pAAGGAAGCC TTGGAGT thioph.-carb.-ACTCCAAAGC CTTTCCTT	W1282X
49. 50. 51. 52.	fluorescein-GGCACCAITA AAGAAATAT CAT pATGATATTT CTTTATGCT GCC pTGGGTGTTCC TATGATGAT ATA-ビオチン biotin-TATATTGATC ATAGGAACA CCA	AF508



# 実施例 9 : LCR 反応条件

実施例 8 の標識オリゴを、以下の濃度の試薬を用い、実質的に欧州特許出願公開第 3 2 0 3 0 8 号に記載のごときプラント LCR に使用した。

試薬	終濃度
水	(終容積 45 $\mu$ l を与える量)
反応緩衝液	50mM EPPS pH7.8 150mM KCl 10mM MgCl <sub>2</sub>
オリゴヌクレオチド 41, 42, 43 及び 44	各々 $3.3 \times 10^{11}$ コピー
オリゴヌクレオチド 45, 46, 47 及び 48	各々 $4.2 \times 10^{11}$ コピー
オリゴヌクレオチド 49, 50, 51 及び 52	各々 $2.7 \times 10^{11}$ コピー
NAD	0.1mM
BSA	5 $\mu$ g
試料	250ng DNA
熱油	2滴 / 試験管

混合物を 100℃ で 3 分間加熱し、室温に冷却し、下記の試薬を 5  $\mu$ l の量で添加した。

試薬	終濃度
<i>Thermus thermophilus</i> 由来の DNA リガーゼ	3400 U/50 $\mu$ l

混合物に 45 サイクルのプログラムされた温度変化を実施

5 4 2 X DNA 増幅後は (ストリップ 1 及び 2) スポットは見られない。ストリップ 3 上には 1 つのスポットしか現れず、それはストリップの左側付近 (抗チオフェンカルバゾール固定部位) に位置し、W 1 2 8 2 DNA のみの増幅が陽性であることを示している。ストリップ 4 上にもただ 1 つのスポットが現れており、それはストリップの中央付近 (抗フルオレセイン固定部位) にあり、 $\Delta$  F 5 0 8 DNA の増幅が陽性であることを示している。ストリップ 5 上にもただ 1 つのスポットが現れており、それはストリップの右側付近 (抗ダンシル固定部位) に位置し、G 5 5 1 D DNA の増幅が陽性であることを示している。

12 種類全てのオリゴが全ての反応試験管中に存在し、3 種類全ての突然変異由来の DNA を増幅し得たが、各試料中に実際に存在する特異的 DNA のみが増幅された。各患者は特定の突然変異においてヘテロ接合であり、これは、各々が 1 つの正常な遺伝子をも有していたことを意味する。正常遺伝子がいずれかのオリゴヌクレオチドによって増幅されたケースはなかった。

施した。1 サイクルは 85℃ で 30 秒間、57℃ で 20 秒間からなった。熱サイクルは TempCycler™ (Coy Laboratory Products, Ann Arbor MI) において実施した。

## 実施例 10 : 囊胞性線維症突然変異患者試料の分析

囊胞性線維症患者から得たヒト DNA 試料の突然変異 G 5 5 1 D、W 1 2 8 2 X 及び  $\Delta$  F 5 0 8 の存在をオリゴ 4 1 ~ 5 2 を使用して分析した。かかる分析は、試料 DNA に実施例 9 に従う LCR を実施し、次いで得られたミックスを実施例 6 に従ってイムノクロマトグラフィーすることにより実施した。試薬は前と同様に調製した (実施例 4 ~ 6 参照)。

図 3 に、イムノクロマトグラフィー後のニトロセルロースストリップの写真を示す。これは、(左下から右上のスポットにおいて) CF 突然変異 W 1 2 8 2 X、 $\Delta$  F 5 0 8 及び G 5 5 1 D に特異的な増幅産物が存在することを示している。試料は、1) 水 (DNA なし)、2) G 5 4 2 X 突然変異においてヘテロ接合の患者、3) W 1 2 8 2 X 突然変異においてヘテロ接合の患者、4)  $\Delta$  F 5 0 8 突然変異においてヘテロ接合の患者、及び 5) G 5 5 1 D 突然変異においてヘテロ接合の患者のものであった。水または G

## 〔配列表〕

配列番号 : 1  
配列の長さ : 25  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 1  
配列

CACTGCGGGT TTTGCAGAAC AATAA 25

配列番号 : 2  
配列の長さ : 22  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 22  
配列

ATTGTTCTGC AAAACCCGCA GT 22

配列番号 : 3  
配列の長さ : 23  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 23

## 配列

GTAAGTAGTA CCCTGGACAA GGT

23

配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 1

配列

GACCTTGTC AGGTACTAC TTACA

25

配列番号: 5

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列

CAAGTTTTC CTCACAAGT GAGCA

25

配列番号: 6

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 23

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 1

配列

TACATCCTTC TCAATGTCCA ATAGA

25

配列番号: 10

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 23

配列

CTATTGGACA TTGAGAAGGA TGT

23

配列番号: 11

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 23

配列

GCCCCAAAT GCGAACATTC CAT

23

配列番号: 12

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

## 配列

GCTCACTTGT TGAAGCAAAA CTT

23

配列番号: 7

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 22

配列

GAAGCCATCC AGGAAGTGGG AA

22

配列番号: 8

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 1

配列

ATTTCACCTT CCTGGATGGC TTCAA

25

配列番号: 9

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 1

配列

TATGGAATGT TCGCATTTGG GGGCA

25

配列番号: 13

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 1

配列

ACAGGCTGTA ACCACCACTC AGCCA

25

配列番号: 14

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

配列の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表わす記号: misc feature

存在位置: 23

配列

GGCTGAGTGG TGGTGACAGC CTA

23

<p>配列番号：15            配列の長さ：23            配列の型：核酸            配列の数：一本鎖            トポロジー：直鎖状            配列の種類：Genomic DNA            配列の特徴              特徴を表わす記号：misc feature              存在位置：23            配列</p>	<p>CGCTAAGACA GACAACCTGA ATG</p>	23	<p>配列</p>	<p>CGTGATAAGC TGACAGAGTG AAACA</p>	25
<p>配列番号：16            配列の長さ：25            配列の型：核酸            配列の数：一本鎖            トポロジー：直鎖状            配列の種類：Genomic DNA            配列の特徴              特徴を表わす記号：misc feature              存在位置：1            配列</p>	<p>CCATTACAGT TGTCTGTGT AGTGA</p>	25	<p>配列</p>	<p>GTTCACCTCT GTCAGCTTAT CACG</p>	24
<p>配列番号：17            配列の長さ：25            配列の型：核酸            配列の数：一本鎖            トポロジー：直鎖状            配列の種類：Genomic DNA            配列の特徴              特徴を表わす記号：misc feature              存在位置：1            配列</p>	<p>CTACTTGCCC TTTCAGGCGT TAACA</p>	25	<p>配列</p>	<p>GTTAAGGCTT GAAAGGCCAA GTAG</p>	24
<p>配列番号：21            配列の長さ：25            配列の型：核酸            配列の数：一本鎖            トポロジー：直鎖状            配列の種類：Genomic DNA            配列の特徴              特徴を表わす記号：misc feature              存在位置：1            配列</p>	<p>TTTACGCTGC AGGCGATTG ACAGA</p>	25	<p>配列</p>	<p>CTGTTCAGAA ATGGCGGCGT TTT</p>	23
<p>配列番号：22            配列の長さ：23            配列の型：核酸            配列の数：一本鎖            トポロジー：直鎖状            配列の種類：Genomic DNA            配列の特徴              特徴を表わす記号：misc feature              存在位置：23            配列</p>	<p>CTGTCAAATC GCCTGCAAGT AAA</p>	23	<p>配列</p>	<p>GTTCAGCTCT GTCAGCTTAT CACG</p>	24
<p>配列番号：23            配列の長さ：23            配列の型：核酸</p>	<p>CTGTCAAATC GCCTGCAAGT AAA</p>	23	<p>配列</p>	<p>GTTCAGCTCT GTCAGCTTAT CACG</p>	24

配列番号: 26  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 22  
 配列

ATTTCCTCCC CAGTTGCATT CA 22

配列番号: 27  
 配列の長さ: 23  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 23  
 配列

CAGCAATCCT CAAAAACAGA TCA 23

配列番号: 28  
 配列の長さ: 25  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1

配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 23  
 配列

CTGCTGCTGT GCTTATCTCC TAT 23

配列番号: 32  
 配列の長さ: 25  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

AATAGGAGAT AACCAACGCA GCAGA 25

配列番号: 33  
 配列の長さ: 25  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

CAAGTTATAA AATCAGAGAG GGTGA 25

配列番号: 34  
 配列の長さ: 23  
 配列の型: 核酸

配列  
 GCATCTGTTT TTGAGGATTG CTGAA 25

配列番号: 29  
 配列の長さ: 25  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

AAGACCTTGA AGAGCAGTTA AATCA 25

配列番号: 30  
 配列の長さ: 23  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 23  
 配列

GATTTAACTG CTCTTCAAGG TCT 23

配列番号: 31  
 配列の長さ: 23  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA

配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 23  
 配列

CACCCCTCTGT GATTTTATAA CTT 23

配列番号: 35  
 配列の長さ: 23  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 23  
 配列

GGTGGGTGAC CTTGAGGATA TCA 23

配列番号: 36  
 配列の長さ: 25  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

TTGATATCCT CAAAGTCACC CACCA 25

配列番号: 37  
 配列の長さ: 24  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

CCTGTGGGGC AAGGTGAACG TGGA

24

配列番号: 38  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 22  
 配列

CCACGTTTAC CTTCGCCAC AG

22

配列番号: 39  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 22  
 配列

配列

TTCTCCACTCA GTGTGATTCC AC

22

配列番号: 43  
 配列の長さ: 21  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 21  
 配列

TCAACGAGCA AGAATTCTT T

21

配列番号: 44  
 配列の長さ: 21  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

AAAGAAATTC TTGCTCGTTG A

21

配列番号: 45  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA

GAAGTGGTG GTBAGGCCCT GG

22

配列番号: 40  
 配列の長さ: 24  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

CCCAAGGCCCT CACCACCAAC TTCA

24

配列番号: 41  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

GTGGAATCAC ACTGAGTGGG GA

22

配列番号: 42  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 1  
 配列

ATTCAATAAC TTGCAACAG TG

22

配列番号: 46  
 配列の長さ: 22  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列の特徴  
 特徴を表わす記号: misc feature  
 存在位置: 22  
 配列

CACTGTTGCA AAGTTATTGA AT

22

配列番号: 47  
 配列の長さ: 18  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA  
 配列

AAGGAAAGCC TTTCGACT

18

配列番号: 48  
 配列の長さ: 18  
 配列の型: 核酸  
 配列の数: 一本鎖  
 トポロジー: 直鎖状  
 配列の種類: Genomic DNA

配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 1  
配列

ACTCCAAAGG CTTTCCTT 18

配列番号 : 49  
配列の長さ : 23  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 1  
配列

GGCACCATTA AAGAAAATAT CAT 23

配列番号 : 50  
配列の長さ : 23  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列

ATGATATTTT CTTTAATGGT GCC 23

配列番号 : 51  
配列の長さ : 23  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA

配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 23  
配列

TGGTGTTC TATGATGAAT ATA 23

配列番号 : 52  
配列の長さ : 23  
配列の型 : 核酸  
配列の数 : 一本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : Genomic DNA  
配列の特徴  
特徴を表わす記号 : misc feature  
存在位置 : 1  
配列

TATATTCATC ATAAGAAACA CCA 23

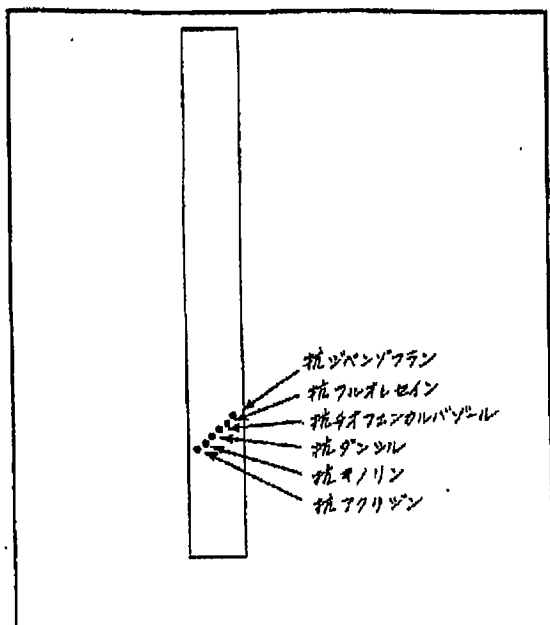


Fig. 1

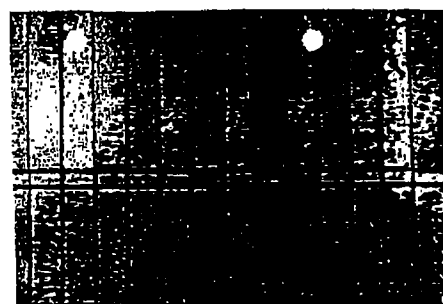


Figure 2a

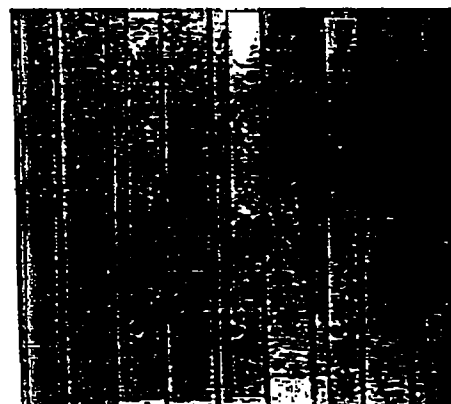


Figure 2b

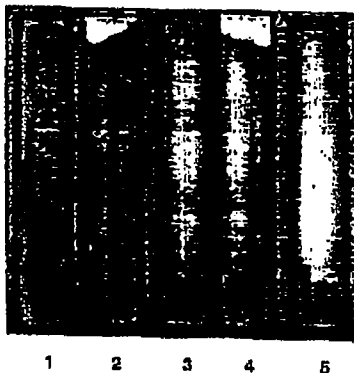


figure 3

国际调查报告		International application No. PCT/US93/0324
D (Continued): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Analytical Biochemistry, Volume 119, issued 1983, R. Hawkins et al., "A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies", pages 142-147, see especially Figure 4.	9, 10, 12-14, 24-31
Y	Therapeutic Drug Monitoring, Volume 12, No. 4, issued July 1990, F. Momen et al., "A simple and disposable visual measuring device to assay antiepileptic drugs from whole blood samples.", pages 359-361, see Abstract.	9, 10, 12-14, 24-31
Y	Therapeutic Drug Monitoring, Volume 11, No. 4, issued 1989, K.S. Oles et al., "Evaluation of an enzyme immunoassay method for carbamazepine: a comparison with enzyme-multiplexed immunoassay technique, fluorescence polarization immunoassay, and high-performance liquid chromatography.", pages 471-476, see Abstract.	9, 10, 12-14, 24-31
Y	US, A, 4,435,504 (Zuk et al) 06 March 1984, Abstract and col. 8, lines 32-40.	9, 10, 12-14, 24-31

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet) (July 1992)

国际调查报告		International application No. PCT/US93/0324
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(5) : G01P 19/04; G01M 53/543 US CL. : 356/91; 435/18 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/91; 436/18		
Documentation searched other than minimum documentation is the extent that such documents are included in the fields searched		
Abstracts (only those abstracted during the International search (name of the source, where practicable, source serial number))		
Please see Exam. Report.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0 336 731 (Wallace) 11 October 1989, Abstract and Examples 5 and 7.	1-26
Y	EP, A, 0 364 233 (Cassidy et al.) 18 April 1990, Abstract and Table I.	1-26
Y	US, A, 4,855,225 (Pung et al) 08 August 1989, columns 5-8.	4-10, 12-22, 24-26
Y	US, A, 4,822,269 (Schnadler et al) 21 November 1989, Abstract and Figure 1a.	11, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Prior art documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> Not patent family members.		
* Special requirements of this document "A" document defining the parameters of the invention in a preliminary form "B" document published in or after the International filing date "C" document which may have been in the prior art but which is not included in the search because it is not in the language of the invention "D" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "E" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "F" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "G" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "H" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "I" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "J" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "K" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "L" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "M" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "N" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "O" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "P" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "Q" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "R" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "S" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "T" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "U" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "V" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "W" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "X" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "Y" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art "Z" document which is not in the language of the invention but which is included in the search because it is in the language of the prior art		
Date of the initial submission of the International search		Date of mailing of the International search report
28 June 1993		06 JUL 1993
Place and mailing address of the ISA/US Commission of Patent and Trademark Box 107 Washington, D.C. 20501		Authorized officer DAVID SCHROEDER
Priority No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 304-1114
Form PCT/ISA/210 (Continuation of first sheet) (July 1992)		

国际调查报告		International application No. PCT/US93/0324
Box I: Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Box I of first sheet)		
This International report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:		
1. <input type="checkbox"/> Claim No.:		
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:		
2. <input type="checkbox"/> Claim No.:		
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:		
3. <input type="checkbox"/> Claim No.:		
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.1(b).		
Box II: Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Box II of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
I. (Multiple Inventions)		
Claim 1-54, drawn to a method of performing multiple assays, should remain, classified in Class 435/91.		
Claim 55-58, drawn to a device and method for performing immunoassays, classified in Class 436/18.		
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.		
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effecting an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.		
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim No.:		
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim No.:		
Remarks on Prior Art <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		
Form PCT/ISA/210 (Continuation of first sheet) (July 1992)		

**B. FIELDS SEARCHED**

Examiner has reviewed C/Class of data base and where practicable source used:

API, BIOC, CA, MEDLINE, WH,

Search terms: Immunity, affinity, chromatography, nucleic acid, polymerization, oligonucleotide, labeled primer, polymerase chain reaction, multiple cloning, differential labeling, ligase chain reaction, clone, immunochromatography, multiple primers

Form PCT/ISA/210 (cont sheet) (July 1992)

フロントページの続き

- (72) 発明者   ゴードン, ジュリアン  
              アメリカ合衆国、イリノイ・60044、レイ  
              ク・ブルフ、イースト・シエリダン・ロー  
              ド・307
- (72) 発明者   ホイジャー, ジョアネル  
              アメリカ合衆国、イリノイ・60005、ハイ  
              ツ、アーリントン、ノース・ウイルク・ロ  
              ード・103

- (72) 発明者   ジユウ, シンシア  
              アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ  
              テイビル、スプリングヘブン・ドライブ・  
              917
- (72) 発明者   ローズ, ジェイムズ  
              アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マン  
              ダレイン、イースト・アランソン・ロー  
              ド・312